

09/144,659

COPY OF PAPERS
ORIGINALLY FILED

INPI

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

PATENT

RECEIVED

JUL 25 2002

TECH CENTER 1600/290

UTILITY CERTIFICATE - CERTIFICATE OF ADDITION

OFFICIAL COPY

The Director-General of the Institut National de la Propriété Industrielle certifies that the attached document is a true copy of an application for industrial property titleright filed at the Institute.

Drawn up in Paris, 5 FEB. 2001

On behalf of the Director-General of the
Institut National de la Propriété Industrielle
The Patent Department Head

(signature)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLEREGISTERED OFFICE
26bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cedex 08
Telephone: 01 53 04 53 04
Fax: 01 42 93 59 30
<http://www.inpi.fr>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INPI
INSTITUT NATIONAL DE LA
PROPRIETE INDUSTRIELLE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Telephone: 01 53 04 53 04 Telefax: (1) 42 93 59 30

PATENT, UTILITY CERTIFICATE
Intellectual Property Code - Book VI

Cerfa
No. 55-1328

REQUEST FOR GRANT

Confirmation of filing by fax

This form is to be completed in black ink and in block capitals

Reserved for the INPI		1. NAME AND ADDRESS OF THE APPLICANT OR THE REPRESENTATIVE TO WHOM THE CORRESPONDENCE IS TO BE ADDRESSED		
DATE OF SUBMISSION OF THE DOCUMENTS 31 JUL. 1998		AVENTIS PASTEUR DPI 2 avenue au Pont PASTEUR 69007 LYON		
NATIONAL REGISTRATION 98/10.027				
DEPARTMENT OF FILING Ly				
DATE OF FILING 31 JUL. 1998				
2. APPLICATION		Nature of the industrial property right		
<input checked="" type="checkbox"/> patent		<input type="checkbox"/> divisional application		
		→ initial application ↓		
<input type="checkbox"/> utility certificate		<input type="checkbox"/> conversion of a European patent application <input type="checkbox"/> patent <input type="checkbox"/> utility certificate No. date		
Compilation of the search report		<input type="checkbox"/> deferred <input checked="" type="checkbox"/> immediate		
The applicant, as a physical person, asks to pay the fee by instalments		<input type="checkbox"/> yes <input type="checkbox"/> no		
Title of the invention (maximum 200 characters) Trimer of the HIV env gene expression product				
3. APPLICANT(S) SIREN No. 3 4 9 5 0 5 3 7 0		APE-NAF code 2 4 4 C		
Name and forenames (underline the surname) or company name PERSON FILING PASTEUR MERIEUX Sérum et Vaccins		Legal form S.A.		
Proprietor AVENTIS PASTEUR				
Nationality/Nationalities French				
Full address(es) 58, Avenue Leclerc 69007 LYON		Country FRANCE		
2 avenue au Pont PASTEUR 69007 LYON				
If insufficient space, continue on plain paper <input type="checkbox"/>				
4. INVENTOR(S) The inventors are the applicants		<input type="checkbox"/> yes <input checked="" type="checkbox"/> no		If the answer is no, provide a separate designation
5. REDUCTION OF THE RATE OF FEES		<input type="checkbox"/> requested for the first time <input type="checkbox"/> requested prior to filing: attach copy of the favourable decision		
6. PRIORITY DECLARATION OR APPLICATION FOR THE BENEFIT OF THE FILING DATE OF A PRIOR APPLICATION				
Country of origin		Number		Filing date
				Nature of the application
7. DIVISIONS previous to the present application		No.		date
8. SIGNATURE OF THE APPLICANT OR REPRESENTATIVE (name and capacity of the signatory - registration No.) Florent GROS (signature)		SIGNATURE OF THE RECEIVING OFFICIAL D. GIRAUD (signature)		SIGNATURE AFTER REGISTRATION OF THE APPLICATION AT THE INPI (illegible signature)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INPI

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE**

PATENT, UTILITY CERTIFICATE

PATENTS ADMINISTRATIVE DIVISION

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Tel: 01 53 04 53 04 - Fax: 01 42 93 59 30

DESIGNATION OF THE INVENTOR
(if the applicant is not the inventor or the sole inventor)

NATIONAL REGISTRATION NO.
98/10,027

TITLE OF THE INVENTION:

Trimer of the HIV env gene expression product

THE UNDERSIGNED

PASTEUR MERIEUX Sérum et Vaccins
58, avenue Leclerc
69007 LYON - FRANCE

DESIGNEE(S) AS INVENTOR(S) (surname underlined, forenames, address):

Michel CHEVLAIER
19, rue de la Guillotière
38270 BEAUREPAIRE
FRANCE

NOTE: In exceptional cases, the name of the inventor may be followed by that of the company to which he belongs (membership company) when the latter is other than the company which is the applicant or proprietor.

Date and signature(s) of the applicant(s) or of the representative

Lyon, 10 November 1999
Nathalie SCHAEFFER
European Representative
(signature)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Trimer of the HIV env gene expression product

The present invention relates to a method for obtaining recombinant proteins, the origin of which is the membrane of the HIV virus responsible for the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS), allowing the restoration of their native trimeric form, and to the use of these proteins for the purpose of vaccination or of diagnosis.

10

State of the art

The HIV envelope glycoprotein is encoded by the "env" gene, and the translation of the corresponding mRNA gives a glycosylated protein, gp160, in the form of a precursor with a molecular mass of 160 kDa. gp160 is cleaved inside the cell to give, at the cytoplasmic membrane during budding of the virus in the process of formation, on the one hand gp120, which is found on the outside of the cell and of the virus, and on the other hand gp41, which is the transmembrane portion of the glycoprotein and which corresponds to the carboxy-terminal end of the precursor. Once the viral particle has been released, gp41, the only transmembrane protein, will have its carboxy-terminal end turned toward the inside of the virus and its amino-terminal end projecting on the outside, maintaining itself associated noncovalently with gp120. It is attached noncovalently to gp41 via its amino-terminal end, while the rest of the protein is involved in the recognition of the CD4 receptor and of the CCR5 or CXCR4 coreceptors (specific for auxiliary T4 lymphocytes, macrophages; Trkola et al., J. Virol., 72, 1876-85, 1998; Schols et al., J. Virol., 72, 4032-4037, 1998; Rubbert et al., J. Immunology, 160, 3933-3941, 1998). The binding of gp120 to CD4 makes it possible to expose the membrane of the target cell to the amino-terminal hydrophobic portion of gp41, thereby inducing the mechanism of fusion of the viral and cell membranes, this fusion being the cause of the penetration of the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

virion into the target cell during infection (Wong-Staal *et al.*, In Molecular Genetic Medicine, 2, Friedman ed., 189-219, 1992; Berger *et al.*, *Nature*, 391: 240, 1998).

5 This process of recognition of the viral receptor, followed by the fusion of the membranes due to the interaction of the amino-terminal end of the fusion protein with the target cell membrane, is not a mechanism unique to HIV. It is made possible due to the
10 presence, in oligomeric form, of the transmembrane glycoproteins of the virus. Bridging using chemical agents has made it possible to demonstrate trimers within the glycoproteins of the MuLV (Pinter *et al.*, *J. Virol.*, 30, 157-165, 1979), and MuMTV (Racevskis *et*
15 *al.*, *J. Virol.*, 35, 937-948, 1980) envelope. It has also been shown that the RSV envelope protein forms oligomers which are found in infected cells and viral particles (Einfeld *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8688-8692, 1988). The influenza virus also
20 expresses, at its surface, a haemagglutinin in trimeric form. In the latter case, the multimeric form is required for the intracellular transport of the protein (Copeland *et al.*, *J. Cell. Biol.*, 103, 1179-1191, 1986). The [lacuna] influenza also expresses, at its
25 surface, a neuraminidase in the form of a tetramer (Varghese *et al.*, *Nature*, 303, 35-40, 1983).

Although there is no doubt about the oligomeric nature of the various proteins encoded by the *env* gene, the monomer number has, itself, remained a
30 controversial subject for a long time. The gp160 glycoprotein has, in fact, for a long time been described as being able to assemble into dimers or tetramers (Pinter *et al.*, *J. Virol.*, 63, 2674-2679, 1989; WO 94/00557 of the CNRS; Schawaller *et al.*,
35 *Virology*, 172, 367-369, 1989; Earl *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87, 648-652, 1990; Earl *et al.*, *J. Virology*, 68, 3015-3026, 1994). Other more recent reports have, however, demonstrated that gp160 might, in fact, associate naturally, via its gp41 portion, in

THIS PAGE BLANK (USPTO)

the form of trimers (Min Lu et al., *Nature Structural Biology*, 2, 1075-1082, 1995; Weisshorn et al., *EMBO J.*, 15, 1507-1514, 1996; Weisshorn et al., *Nature*, 387, 426-430, 1997), the dimeric or tetrameric forms 5 resulting, in fact, from aberrant interchain disulphide bridges or from transient oligomeric forms (see below).

For vaccinal purposes, the HIV envelope glycoprotein can be produced and purified, either by culturing the HIV virus on cell lines and purifying the 10 glycoprotein from the culture medium (WO 94/00557 of the CNRS), or by expressing a recombinant of this protein using a vector other than HIV and purifying it from the culture medium (WO 91/13906, Chiron).

The purification of gp160 from cells infected 15 with HIV makes it possible to obtain only tetramers, which is probably a transient oligomeric form, i.e. a form which does not correspond to that taken by its gp41 portion at the surface of the virus (WO 94/00557 of the CNRS).

20 The expression of a gp160 recombinant using a vector other than HIV, although having the advantage of escaping the dangers linked to the HIV infectious agent, does not make it possible also to have the "native" oligomeric structure of gp160. Specifically, 25 VanCott et al. have shown that the recombinant gp160 expressed by vaccinia, although having the power to adhere to CD4, comprises structural differences (*J. Imm. Meth.*, 183, p. 114, col. 1, li. 19-22, 1995). Randall et al. have also shown that the recombinant 30 gp160 expressed by vaccinia comprises aberrant interchain disulphide bridges (*Virology*, 179, 827-833, 1990).

Recently, Parren et al. have demonstrated a correlation between the production of antibodies which 35 can neutralize, *in vitro*, HIV infection of cells and the oligomeric nature of gp120 (*J. of Virology*, 72, 3512-3519, 1998). For this, Parren et al. used a gp120 expressed by HIV in infected cells, probably in order to get round the problems linked to the structural

THIS PAGE BLANK (USPTO)

differences between a native gp120, expressed at the surface of HIV, and those produced by expression vectors such as vaccinia.

Moreover, it is known that antibodies specific for the oligomeric structure of gp160 can be generated (Earl et al., above), and participate, in fact, in a neutralizing effect against HIV infection of cells, *in vitro*.

The present invention is directed towards providing a method for obtaining recombinant env gene expression products, which allows the restoration of their trimeric form, this form possibly being used in the context of a vaccination or in carrying out a diagnosis of HIV infection. In fact, the clinical trials carried out on recombinant gp160 molecules pose the problem of the spectrum of inhibition, which remains limited to only a few viral strains (Pialoux et al., Aids Res. Hum. Retr., 11, 373-381, 1995; Salmon-Céron et al., Aids Res. Hum. Retr., 12, 1479-1486, 1995).

To date, although the trimeric form of a gp160 has been identified several times in a mixture of other polymeric forms, no-one has purified, nor suggested purifying, the trimeric form of gp160. The present [lacuna] is aimed at overcoming this need.

Summary of the invention

For this purpose, the invention relates to any purified recombinant glycoprotein which satisfies the following properties:

- a) a capacity for adhesion to CD4;
- b) an affinity with an anti-gp120 antibody capable of neutralizing HIV infection of cells, *in vitro*;
- c) an affinity with an anti-gp41 antibody;
- d) a trimeric form lacking interchain disulphide bridges.

A second subject of the present invention relates to a vaccine comprising the purified

THIS PAGE BLANK (USPTO)

glycoprotein according to the invention, and an adjuvant.

A third subject of the present invention relates to the use of the glycoprotein according to the 5 invention in the implementation of any method for diagnosing, *in vitro*, infections caused by HIV.

A final subject of the present invention relates to a method for obtaining a glycoprotein according to the invention, in which, by means of 10 genetic recombination techniques, a glycoprotein satisfying the properties a), b) and c) according to the invention is expressed, purified and subjected to steps involving at least one reducing agent, one ionic detergent and/or one neutral detergent, under 15 conditions such that a glycoprotein satisfying the conditions according to the invention is obtained.

Detailed description of the invention

In the context of the present invention, the 20 capacity for adhesion to CD4 can be determined by radio-immune precipitation, by ELISA or by surface plasmon resonance, the detail of these methods being set out in the remainder of the description. These methods can be modified within the limit of current 25 knowledge, the objective being to simply make sure that the glycoprotein according to the invention indeed forms a complex with CD4.

The CD4 molecules can be prepared in all kinds of different ways, including purification from a 30 natural source or using genetic recombination techniques. In this context, it is possible to use the CD4 molecules described in WO 89/03222, WO 89/02922, Smith *et al.* (Science, 238, 1704-1707, 1987) and Littman *et al.* (Nature, 325, 453-455, 1987), for 35 example. The company ERC BioServices Corporation, 649A Lofstrand Lane, Rockeville, MD 20850, USA, also sells a CD4 produced by CHO ST4.2 cells (*In: Aids Research and Reference Reagent Program Catalog*, the Nat. Inst. Health U.S.D.H.H.S.), for example.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Preferably, the capacity for adhesion is at least identical to that of a gp120 of an infectious HIV strain, for example a gp120 originating from the SF2, HXB2, BRU, MN, SC, NY5, CDC4, WMJ2, RF, MAL, ELI, Z96, 5 Z3, Z321 and JY1 5 isolates (Myers et al., Human Retroviruses and Aids, Los Alamos, New Mexico, 1990), or from the other isolates described by Tersmette et al. (J. Virol., 62, 2026-2032, 1988), Popovic et al. (Science, 224, 497-500, 1984), and EP541753 (Transgene 10 S.A.), for example.

The affinity (K_d) measured by surface plasmon resonance can also be of the order of 10^{-4} to 10^{-12} M, preferably 10^{-9} to 10^{-11} M, which is in accordance with the affinities already measured for gp120 molecules 15 (Smith et al., Science, 238: 1704, 1987; Lasky et al., Cell, 50: 975, 1987), for example.

The recombinant glycoprotein according to the invention also has an affinity with an anti-gp120 antibody capable of neutralizing, *in vitro*, HIV 20 infection of cells. The term "antibodies" includes all immunoglobulins or fragments of these immunoglobulins, of polyclonal, monoclonal or chimeric original [sic] (see US4816397), for example. All known antibodies, or antibodies likely to be prepared, capable of 25 recognizing an epitope of gp120 and of neutralizing, *in vitro*, the infection of cells by an HIV may be taken into account in the context of the present invention. In order for an HIV glycoprotein to be considered as 30 satisfying the needs of the present invention, it merely needs to have an affinity with an antibody of this type. Without wishing to be limited by the techniques and antibodies which can be used for the needs of the invention, mention may be made, by way of information, of the articles by VanCott et al. (1995, 35 above) and Earl et al. (1994, above), for example.

With regard to the assays for measuring the neutralizing efficiency of an antibody *in vitro*, mention may be made of the articles by Pialoux et al. (1995, above) and Salmon-Céron et al. (1995, above),

THIS PAGE BLANK (USPTO)

for example. In order to consider that the antibody satisfies the needs of the present invention, neutralization, *in vitro*, of HIV infection of cells merely has to be observed, whatever the neutralization 5 threshold.

Moreover, the recombinant glycoprotein according to the invention also has an affinity with an anti-gp41 antibody. The comments set out above apply *mutatis mutandis* to gp41, with the difference that the 10 neutralizing effect of an anti-gp41 antibody is not important, while at the same time possibly being a preferential criterion not to be ignored.

The measurement of the affinity of the glycoprotein in trimeric form with the anti-gp41 and 15 anti-gp120 antibodies can be carried out through direct immunological reaction with the antibody, or by ELISA, for example. The operating conditions can vary within the limits of current knowledge, the variations and/or 20 adaptations with respect to known techniques not, in fact, representing a difficult obstacle for those skilled in the art.

The trimeric form of the glycoprotein according to the invention can be observed on SDS PAGE gel, possibly under reducing conditions (see Example 1). 25 Those skilled in the art may, however, use any kind of other analyses, such as analytical centrifugation or analysis by light diffusion. The objective is simply to demonstrate the association of three gp160 molecules which are not linked by interchain bridges.

30 The glycoprotein according to the invention, in satisfying the properties set out above, can therefore be composed of all or part of the gp41 protein, and of all or part of the gp120 protein. As a result, this glycoprotein can be encoded by all or part of an env 35 gene, which may or may not be native (originating from an HIV isolate), said glycoprotein being either purified at a stage when the cleavage has not yet taken place *in situ*, or said cleavage being made nonfunctional either because of the nature of the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cellular host, which does not have the required enzymes, because of inhibitors of these enzymes, or because the cleavage site has been genetically modified, for example.

5 The genetic modification of the cleavage site is well known to those skilled in the art, and makes it possible to obtain whole proteins, of varying sizes, containing all or part of the gp41 and all or part of the gp41 [sic]. By way of nonlimiting information, 10 mention may be made of the gp160 and gp140 glycoproteins described by EP541753 (above), EP679187 (above), Earl *et al.* (1994, above) and Kieny *et al.* (1988, above), the technical teaching of this literature being incorporated by way of reference into 15 the description of the present invention.

More particularly, it is possible to use, as a source of env gene, all known HIV isolates, in particular those described above. The cloning can be advantageously carried out by the PCR technique, 20 followed by insertion of the DNA fragment into a suitable vector. The cleavage site(s) can then be deleted by site-directed mutagenesis, as described by Kieny *et al.* (1988, above) or in Example 1 below. The preparation of the vectors, and all the other technical 25 procedures, can be carried out according to the protocols described in the manuals by Sambrook *et al.* (Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, U.S.A., 1989).

The expression vector in which the DNA fragment 30 encoding a glycoprotein according to the invention is finally cloned can be a plasmid, a phage, a whole virus DNA, a cosmid, a DNA intended to integrate into a cell, etc. This vector preferably comprises sequences which regulate the expression of the env gene and, where 35 appropriate, other sequences which regulate the translocation of the glycoprotein towards the membrane of the host producer cell. Host cells which are the most suitable, due to glycosylation which is close, or even identical, to that desired, are higher eukaryotic

THIS PAGE BLANK (USPTO)

cells, which can include, for example, immortalized cell lines originating from monkeys (Cos-7, ATCC CRL 1651; Vero76, ATCC CRL 1587), from hamsters (BHK, ATCC CRL 10; CHO, PNAS USA, 77: 4216, 1980), from mice (TM4, 5 Mather, Biol. Reprod., 23, 243-251, 1980), from humans (Hela, ATTC CCL2; WI38, ATCC CCL75; Hep G2; HB 8065), or from dogs (MDCK, ATCC CCL34), etc.

The most suitable expression vectors are those which reproduce in eukaryotes, in particular the 10 vaccinia virus which is well known in the prior art (WO 86/07593), for example.

In a particular embodiment of the present invention, it is possible to produce in particular gp160 molecules according to the teaching described in 15 EP541753 (above), or gp140 molecules according to the method of Earl *et al.*, (1990, above), or even any other glycoprotein variant in which one or more portions of gp41 and/or gp120 will be removed, the objective being that the gp41 portion is sufficient for trimer 20 formation to take place, and that the gp120 portion is sufficient to be recognized by neutralizing anti-gp120 antibodies and by CD4. In order to choose modified env genes which satisfy the needs of the present invention, those skilled in the art are able to proceed step by 25 step or randomly, and then to choose, from the sequences which do not satisfy our needs, those which do satisfy them.

After having produced the glycoprotein by 30 genetic recombination techniques or by HIV infection of cells, it is purified by means of techniques known to those skilled in the art, in particular those which involve lentil lectins (Pialoux *et al.*, 1995, above; Salmon-Céron *et al.*, 1995, above), that described in WO 91/13906 (above) which can also be optionally 35 adapted to the needs of the present invention, or even those described in Example 1 (immunoaffinity), for example.

With regards to the recombinant proteins, it may be noted that a portion of the glycoproteins thus

THIS PAGE BLANK (USPTO)

purified has interchain disulphide bridges, whatever the nature of the host or of the vector used. The glycoproteins associate, in fact, as dimers (a portion being covalent) which are visible on SDS PAGE gel after 5 fixing with a bridging agent. With regards to the glycoproteins purified from HIV infected cells, they are also in the form of tetramers (WO 94/00557, above).

In order to satisfy the needs of the present invention, the glycoproteins are therefore dissociated, 10 and then they are subjected to conditions which promote their natural reassembly, i.e. in the form of trimers. For this, the glycoprotein is subjected to steps which involve at least one reducing agent, one ionic detergent and/or one neutral detergent, under 15 conditions such that a glycoprotein which satisfies the needs of the present invention is obtained.

One or more reducing agent(s) may be chosen from dithiothreitol, β -mercaptoethanol, reduced glutathione or sodium borohydride molecules, for 20 example.

One or more ionic detergent(s) may be chosen from the salts of dodecyl sulphate, in particular sodium dodecyl sulphate (SDS) or lithium dodecyl sulphate, the salts of dioctyl sulphosuccinate (sodium 25 dioctyl sulphosuccinate, for example), the salts of cetyltrimethylammonium (bromium cetyltrimethylammonium, for example), the salts of cetylpyridinium (chlorine cetylpyridinium, for example), the N-dodecyl- or N-tetradecylsulphobetaines, the zwittergents 3-14 and 30 3-[(3-chloamidopropyl)dimethylamino]-1-propane sulphonate (CHAPS), for example.

Similarly, one or more neutral detergent(s) may be chosen from tween20®, tween80®, octylglucoside, laurylmaltoside, hecameg®, lauryldimethylamine, 35 decanoyl-N-methylglucamide, polyethylene glycol lauryl ether, triton X100® and Lubrol PX®, for example.

The operating conditions should be sufficient to dissociate the glycoproteins and reassemble them as trimers. For this, generally, the glycoproteins can be

THIS PAGE BLANK (USPTO)

dissociated using one or more ionic detergent(s), in the presence or absence of a reducing agent, and then the reassembly of the monomers can be promoted by substituting the ionic detergent with a neutral 5 detergent, by means of dialysis, for example. In this way, the production of a glycoprotein according to the invention, comprising less than 50% of other protein contaminants (mainly consisting of covalent dimers), is ensured.

10 Preferably, in order to obtain exclusively glycoprotein trimers according to the invention, the purified glycoproteins are subjected, in the course of the treatment, to a reducing agent so as to release the covalent dimers, free sulphhydryl functions are, where 15 appropriate, blocked by means of suitable molecules, for instance alkylating agents such as N-ethylmaleimide or iodoacetamide, and then the remaining sulphhydryl functions are gently reoxidized in the presence of an oxidizing agent such as oxidized glutathione, for 20 example.

In a particular embodiment of the present invention, the purified glycoprotein can be subjected successively to a reducing agent, to an alkylating agent, to an oxidizing agent, to an ionic detergent and 25 to dialysis against a neutral detergent, for example.

In another particular embodiment of the present invention, the purified glycoprotein can be subjected successively to an ionic detergent, to a reducing agent, to an oxidizing agent and to dialysis against a 30 neutral detergent.

At the end of the method the neutral detergent can be substituted with a suitable buffer, for example by means of dialysis.

Another subject of the present invention 35 relates to a vaccine comprising the glycoprotein according to the present invention, and an adjuvant. This vaccine can contain, as an HIV surface antigen, only the glycoprotein according to the present invention, the dimeric or monomeric forms of a gp160 or

THIS PAGE BLANK (USPTO)

gp120 being specifically excluded, for example, for reasons of reduced immunogenicities. Other valences concerning other diseases can also be added to this vaccine, the amounts of antigens and/or the formulation 5 of each valence probably having, however, to be optimized so as to ensure an effective immune response, for example. The valences of other pathogens can originate from bacteria, from viruses or from parasites, for example those causing hepatitis (types A 10 to G), measles, mumps, polio, tuberculosis, diphtheria, malaria, etc.

Among the adjuvants which can be used, it is possible to list all the aluminium salts, such as the aluminium phosphates and hydroxides; Freund's adjuvant; 15 N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanine-2-[1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-(hydroxyphosphoryloxy)] (see Sanchez-Pescador *et al.*, *J. Immu.*, 141, 1720-1727, 1988); the molecules derived from *Quillaja saponaria*, such as Stimulon® (Aquila, US); the Iscoms® (CSL Ltd, 20 US); all molecules based on cholesterol and analogues, such as DC Chol® (Targeted Genetics); the glycolipid Bay R1005® (Bayers, DE); the antigens of *Leishmania brasiliensis*, such as LeIF (technical name) available from Corixa Corp. (US), the polymers of the 25 polyphosphazene family, such as Adjumer (technical name) available from the "Virus Research Institute" (US).

The vaccine compositions according to the invention can be used for preventing HIV-1 infections, 30 the dose and the route and frequency of administration probably having, however, to be optimized so as to obtain an effective immune response.

A final subject of the present invention relates to the use of the glycoprotein according to the 35 invention in the implementation of any method for diagnosing, *in vitro*, infections caused by HIV.

Other characteristics of the present invention will become apparent in the course of the following descriptions of examples of embodiments, which are

THIS PAGE BLANK (USPTO)

provided for the purposes of illustrating the present invention and which are not intended to be limiting. The manipulation of the cells, the preparation of the vectors, the transformation of cells and all the other 5 technical procedures are, where not otherwise specified, carried out according to the protocols described in the manual by Sambrook et al. (1989, above). These examples are preceded by a brief description of Figure 1 and of the methods measuring 10 the affinity of gp160 for CD4.

Demonstration of an affinity for CD4 by radio-immune precipitation: a recombinant CD4 labelled with sulphur 35, produced by CHO cells (Genentech, USA; 15 VanCott et al., 1995, above), is used. Coprecipitation experiments are then carried out, during which the CD4 is added, in an increasing amount, to a fixed amount of purified gp160 in trimeric form in order to determine the saturation point, and then they are coprecipitated 20 with an anti-gp160 antiserum. For this, the CD4 and the gp160 are mixed for 1 h at 4°C, the antibody (OKT4, Ortho Diagnostics, US) antibody is added, and the complexes are washed and separated by electrophoresis.

25 Demonstration of an affinity for CD4 by ELISA: the measurement of the affinity constants of CD4 for the glycoprotein according to the invention is carried out using the technique of Friguet et al. (J. of immunological methods, 77, 305-319, 1985).

30 Measurement of the affinity of the gp120 on CD4 by surface plasmon resonance: the Biacore® is a machine for analysing biospecific interactions in real time and without labelling, which uses the principle of surface 35 plasmon resonance. During the analysis, one of the interacting components (the ligand) is coupled to a hydrophilic (dextran) or hydrophobic (HPA surface) matrix. The other interacting component (analyte) passes in contact with the surface via a microfluid

THIS PAGE BLANK (USPTO)

transfer cartridge. The increase in mass close to the surface due to the interaction between the molecules is represented as a function of time on a sensorgram. Various types of coupling chemistry allow for the 5 attachment of practically all the biomolecules to the matrix. The user therefore creates a biospecific surface which is tailor-made for each type of application. In practice, the glycoprotein according to the invention is coupled to the matrix and various 10 concentrations of CD4 are sent, by the machine, into contact with this matrix. Each time, the mass of CD4 attached to the glycoprotein is recorded. The Biaeval3® software automatically calculates the dissociation constant of the CD4 on the gp120.

15

Figure 1: representation of the SDS PAGE analysis under reducing conditions, obtained with the gp160 produced by VVTG9150, purified, treated to make trimers and attached using a bridging agent (col. 3 and 4); in 20 comparison with that obtained under reducing conditions with the gp160 produced by VVTG9150, purified and directly attached (col. 2); in comparison with that obtained under reducing conditions with monomers of gp160 (col. 5 and 6); and in comparison with that 25 obtained under nonreducing conditions with the gp160 produced by VVTG9150 and purified (col. 7).

Example 1

A recombinant vector based on the vaccinia 30 virus, VVTG9150, is used for the production of gp160. The construction of the plasmid for transferring the gene encoding the hybrid env protein HIV-1_{MN/LAI} into the genome of the vaccinia virus VVTG9150 is described below.

35 The *PstI-KpnI* DNA fragment of pTG1163, ref. Kieny et al. (Prot. Eng., 2, 219-225, 1998), which contains the sequence encoding the signal peptide and the first amino acids of the gp120 of the HIV-1_{LAI} virus, is inserted at the *PstI* and *KpnI* sites of the

THIS PAGE BLANK (USPTO)

bacteriophage M13TG130, ref. Kieny et al. (Gene, 26, 91-99, 1983), generating M13TG4147. The *PstI-PstI* fragment of pTG1163, containing all of the gene encoding a gp160/soluble of HIV-1_{LAI}, is introduced into 5 the *PstI* restriction site of M13mp70, generating M13TG4137. The DNA of the bacteriophage M13TG4137 is then cleaved with *BglII*, digested with polymerase I (Klenow fragment) in order to generate a blunt end, and then cleaved with *EcoRI*, in order to be inserted at the 10 *EcoRV* and *EcoRI* sites of the bacteriophage M13TG4147, generating M13TG4158. A deletion is then produced on M13TG4158, with an oligonucleotide, which allows the introduction of an *SphI* site and of an *SmaI* site. The bacteriophage M13TG4168 is obtained. The gene encoding 15 gp120_{MN} is then amplified from DNA of SupT1 cells infected with the HIV-1_{MN} virus, by the PCR technique with oligonucleotides which introduce *SphI* and *SmaI* sites, respectively. The amplified DNA fragment is then digested with *SphI* and *SmaI* and inserted at the 20 corresponding sites of M13TG4168, generating M13TG4174. Site-directed mutagenesis is carried out on M13TG4174 with an oligonucleotide which makes it possible to mutate a potential transcription stop site (TTTTTNT) recognized by the vaccinia virus in the early genes, 25 and to introduce an *EcoRI* restriction site, thus generating M13TG8120. The *PstI-PstI* fragment of M13TG8120 is then cloned into the *PstI* site of the plasmid pTG9148, generating pTG9150 (the virus VVTG9150 after transfection).

30 pG9148 is, moreover, generated in the same way: the sequence corresponding to the H5R promoter of the vaccinia virus is amplified by the PCR technique with oligonucleotides which introduce *BamHI* and *BglII* sites, respectively. The amplified DNA fragment is then 35 digested with *BglII* and *BamHI* and inserted at the corresponding sites of M13TG6131 (Gene, 26, 91-99, 1983), generating M13TG8124. The *BamHI-BglII* fragment of M13TG8124 containing the H5R promoter sequence is introduced into the *BamHI* restriction site of pTG9133,

THIS PAGE BLANK (USPTO)

generating pTG9145. The plasmid pTG9133 was constructed by introducing a *Bam*HI site between the *Cla*I and *Eco*RI sites of pTG1H-TK (Nature, 312, 5990, 163-166, 8 Nov. 1984), by ligating an OTG4451/OTG4452 linker. A 5 multiple cloning site derived from M13TG131 digested with *Bgl*II and *Eco*RI is introduced into the *Bam*HI and *Eco*RI sites of pTG9145, generating pTG9148.

In conclusion, VVTG9150 therefore encodes a hybrid and soluble gp160 in which the gp120 portion 10 derives from HIV-1MN, and the gp41 transmembrane portion originates from an LA1 isolate. Several modifications are also introduced into this coding sequence. Firstly, an *Sph*I restriction site is created immediately downstream of the sequence encoding the 15 signal peptide, without modifying the amino acid sequence. Secondly, a *Sma*I restriction site is created immediately above the cleavage sequence between the gp120 and the gp41, without modifying the amino acid sequence. Thirdly, the two cleavage sites at position 20 507-516 (amino acid numbering in accordance with Myers et al., in: Human retroviruses and AIDS, Los Alamos Nat. Lab., USA, 1994) are mutated (original sequence KRR...REKR mutated to QNH...QEHN). Fourthly, the sequence encoding the hydrophobic transmembrane peptide 25 IFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIV (amino acids 689-710 of Myers et al.) is deleted. Fifthly, a stop codon has been substituted for the second E codon encoding PEGIEE (amino acids 735-740 of Myers et al.), i.e. the 29th amino acid of the intracytoplasmic domain.

30 VVTG9150 is then propagated in order to produce the hybrid gp160 on BHK21 cells, under conventional conditions (Nature, 312, 163-166, 1984).

The hybrid gp160 glycoprotein is then purified 35 successively by ion exchange chromatographies, immunoaffinity chromatography, gel filtration, and concentration. In summary, the culture medium containing the gp160 is passed successively through two DEAE Trisacryl LS Plus® supports, equilibrated in BPG200® and BPG100® columns (Pharmacia) with a pH 8.3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

buffer containing 2.42 g/l of Tris and 1 ml/l of triton X100. Then, the elution fractions containing the gp160 are passed through an AF-Tresyl Toyopearl® (Tosoh Corp, JP) onto which the antibody IAM5F3 has been grafted (publication? [sic]) and which has been equilibrated in a buffer composed of 29.22 g/l of NaCl, 2.42 g/l of Tris and 1 ml/l of triton X100. The elution is collected as soon as the increase in OD is seen on the display, this collection being until return to base line. The pH of the elution is then neutralized with 4% (v:v) of 2M Tris HCl buffer. The neutralized elution is subjected to gel filtration in an XK 50/100® column containing the sephacryl HR S300 support equilibrated in a PBS buffer. If the protein concentration is then lower than 0.44 mg/ml, the elution is concentrated in an Amicon® cell equipped with a YM30 membrane. Then, the elution or the concentrate is inactivated in a water bath at 60°C for 1 h, and it is filtered (0.22 µm) in a Nalgene® flask. It is thus possible to obtain approximately 1.34 mg/ml of gp160 which is 91% pure (visualized on SDS PAGE).

Starting with 560 µl of purified gp160 (1 mg/ml), 65 µl of 1M sodium phosphate buffer, pH 7.8; 5.5 µl of distilled water and 19.5 µl of 250 mM dithiothreitol (DTT) are added, and the mixture is vortexed for 15 s. 51.5 µl of 1M sodium phosphate (NaH_2PO_4), are added, then the sulphhydryl groups are blocked by adding 95 µl of 100 mM N-ethylmaleimide, the mixture is incubated for 15 min, the sulphhydryl groups are reoxidized by adding 32.5 µl of reduced glutathione at 150 mM and 484 µl of oxidized glutathione at 100 mM, and the mixture is incubated for 30 min. The gp160 dimers are then dissociated by adding 13.2 µl of sodium dodecyl sulphate (SDS) at 10%. The sample is placed in a dialysis cassette with a volume of 3 ml, against 3 l of PBS buffer with 10 mM of octylglucoside. The dialysis is carried out overnight at room temperature with gentle stirring. The detergent is finally eliminated by one or more new dialyses against PBS

THIS PAGE BLANK (USPTO)

buffer. The gp160 molecules thus treated are exclusively in the form of trimers.

Figure 1 represents the SDS PAGE analysis under reducing conditions (DTT), obtained with the gp160 produced by VVTG9150, purified, treated to make trimers and attached using the bifunctional bridging agent ethylene glycol-bis(succinimidyl succinate) (EGS) (col. 3 and 4); in comparison with that obtained under reducing conditions with the gp160 produced by VVTG9150, purified and directly attached using the EGS (col. 2: dimers); and in comparison with that obtained under reducing conditions with monomers of gp160 (col. 5 and 6); and in comparison with that obtained under nonreducing conditions with the gp160 produced by VVTG9150 and purified (col. 7: in the absence of a reducing agent, the interchain linkages lead to the formation of dimers, trimers and tetramers).

Example 2

Using the vaccinia virus, a gp120 which is extended by the first 129 amino acids of the N-terminal portion of gp41, as described by Earl et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 648-652, 1990, is expressed. In so far as the gp41 portion is limited to its first 129 amino acids, it does not comprise a transmembrane region. This glycoprotein exhibits, on SDS PAGE gel, a molecular weight of the order of 140 kD and is commonly termed gp140.

This gp140 is purified successively by ion exchange chromatography, affinity chromatography with lentil lectins, and by gel filtration, as described by Pialoux et al. (1995, above) and Salmon-Céron et al. (1995, above).

Starting with 100 μ l of purified gp140 (1 mg/ml), 2 μ l of 250 mM dithiothreitol (DTT) and 10 μ l of SDS (10%) are added, the mixture is incubated for 15 min, 20 μ l of oxidized glutathione (250 mM) are added to it, it is incubated overnight at 4°C, and then the sample is placed in a dialysis cassette with a

THIS PAGE BLANK (USPTO)

volume of 3 ml, against 3 l of PBS buffer containing 10 mM of octylglucoside. The dialysis is carried out overnight at room temperature with gentle stirring. The detergent is finally eliminated by one or more new 5 dialyses against PBS buffer. Against all expectations, this method makes it possible to eliminate all the interchain disulphide bridges without it being necessary to block the sulphhydryl groups with an alkylating agent. The gp140 molecules thus treated are 10 exclusively in the form of trimers.

Example 3

Using the vaccinia virus, a gp160 as described by Kieny et al. (Protein Engineering, 2, 219-225, 1988) 15 is expressed. It is purified as described in Example 1 and then treated with SDS, and it is dialysed against a PBS buffer containing 10 mM of octylglucoside. After treatment, a mixture of noncovalent trimers and of covalent dimers of the gp160 is obtained, the 20 predominant form consisting of trimers.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Claims

1. Purified recombinant glycoprotein which satisfies the following properties:
 - 5 a) a capacity for adhesion to CD4;
 - b) an affinity with an anti-gp120 antibody capable of neutralizing HIV infection of cells, *in vitro*;
 - c) an affinity with an anti-gp41 antibody;
 - 10 d) a trimeric form lacking interchain disulphide bridges.
2. Glycoprotein according to Claim 1, characterized in that the glycoprotein is composed of all or part of gp160.
- 15 3. Glycoprotein according to Claim 1, characterized in that it comprises less than 50% of other protein contaminants.
4. Glycoprotein according to Claim 1, characterized in that the capacity for adhesion to CD4 20 is at least identical to that of a gp120 of an infectious HIV.
5. Vaccine comprising the purified glycoprotein according to Claim 1, and an adjuvant.
6. Vaccine according to Claim 4, characterized in 25 that it contains, as an HIV surface antigen, only the glycoprotein according to Claim 1.
7. Method for obtaining a glycoprotein according to Claim 1, in which, by means of genetic recombination techniques, a glycoprotein satisfying the properties 30 a), b) and c) set out in Claim 1 is expressed, purified and subjected to steps involving at least one reducing agent, one ionic detergent and/or one neutral detergent, under conditions such that a glycoprotein satisfying the conditions set out in Claim 1 is 35 obtained.
8. Method according to Claim 6 [sic], characterized in that the purified glycoprotein is subjected successively to a reducing agent, to an

THIS PAGE BLANK (USPTO)

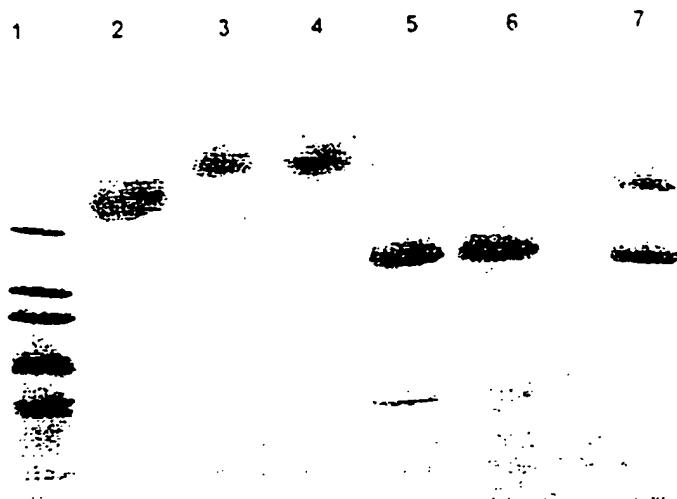
alkylating agent, to an oxidizing agent, to an ionic detergent and to dialysis against a neutral detergent.

9. Method according to Claim 6 [sic], characterized in that the purified glycoprotein is 5 subjected successively to an ionic detergent, to a reducing agent, to an oxidizing agent and to dialysis against a neutral detergent.

10. Use of the glycoprotein according to Claim 1 in the implementation of a method for diagnosing, in 10 *vitro*, infections caused by HIV.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figure 1

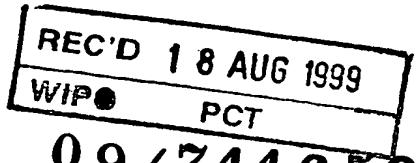


THIS PAGE BLANK (USPTO)

QC



4



FR 99/1871 09/744659

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 04 AOUT 1999

**DOCUMENT DE
PRIORITE**
PRESENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMEMENT A LA REGLE
17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE**

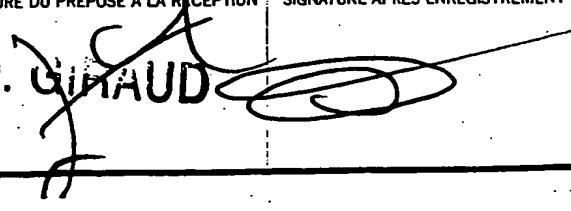
SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
 75800 Paris Cedex 08
 Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Réservé à l'INPI

<p>REQUÊTE EN DÉLIVRANCE</p> <p>Confirmation d'un dépôt par télécopie <input type="checkbox"/></p> <p>Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales</p>		<p>Code de la propriété intellectuelle-Livre VI</p> <p>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</p> <p>Florent GROS Direction de la Propriété Intellectuelle PASTEUR MERIEUX Sérum & Vaccins 58, Avenue Leclerc 69007 LYON</p>																	
<p>DATE DE REMISE DES PIÈCES 31 JUIL. 1998</p> <p>N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 98 10027 -</p> <p>DÉPARTEMENT DE DÉPÔT L7</p> <p>DATE DE DÉPÔT 31 JUIL. 1998</p>		<p>n° du pouvoir permanent PG7161 références du correspondant 04 72 73 70 97</p> <p>téléphone</p>																	
<p>2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire</p> <p><input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen</p> <p><input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°</p> <p>Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat</p> <p>Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non</p> <p>Titre de l'invention (200 caractères maximum)</p> <p style="text-align: center;">Trimère du produit d'expression du gène env de HIV</p>		<p>demande initiale</p>																	
<p>3 DEMANDEUR (S) n° SIREN 3 4 9 5 0 5 3 7 0 code APE-NAF 2 4 4 C</p> <p>Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination</p> <p>PASTEUR MERIEUX Sérum & Vaccins</p>		<p>Forme juridique</p> <p>S.A.</p>																	
<p>Nationalité (s) Française</p> <p>Adresse (s) complète (s)</p> <p>58, Avenue Leclerc 69007 LYON</p>		<p>Pays</p> <p>FRANCE</p>																	
<p>En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre <input type="checkbox"/></p>																			
<p>4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée</p>																			
<p>5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission</p>																			
<p>6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE</p> <table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 25%;">pays d'origine</td> <td style="width: 25%;">numéro</td> <td style="width: 25%;">date de dépôt</td> <td style="width: 25%;">nature de la demande</td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </table>				pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande												
pays d'origine	numéro	date de dépôt	nature de la demande																
<p>7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date</p>																			
<p>8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE <small>(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)</small></p> <p>Florent GROS</p> 		<p>SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION</p> <p>U. GIRAUD</p> 																	
<p>SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI</p>																			

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Trimère du produit d'expression du gène *env* de HIV

La présente invention se rapporte à un procédé d'obtention de protéines recombinantes, ayant pour origine la membrane du virus HIV responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), permettant la restauration de leur forme trimérique native, ainsi que l'utilisation de ces protéines dans un but de vaccination ou de diagnostique.

Etat de la technique

10

La glycoprotéine de l'enveloppe de HIV est codée par le gène "env", et la traduction de l'ARNm correspondant donne une protéine glycosylée, gp160, sous forme d'un précurseur dont la masse moléculaire est de 160 kDa. La gp160 est clivée à l'intérieur de la cellule pour donner, au niveau de la membrane cytoplasmique lors du bourgeonnement du virus en cours de formation, d'une part la gp120 que l'on retrouve à l'extérieur de la cellule et du virus, et, d'autre part, la gp41, partie transmembranaire de la glycoprotéine, qui correspond à l'extrémité carboxy-terminale du précurseur. Une fois la particule virale libérée, la gp41 seule protéine transmembranaire, présentera son extrémité carboxy-terminale tournée vers l'intérieur du virus et son extrémité amino-terminale faisant saillie à l'extérieur, se maintenant associée de façon non covalente à la gp120. Par son extrémité amino-terminale, elle est fixée d'une manière non covalente à la gp41 alors que le reste de la protéine est impliqué dans la reconnaissance du récepteur CD4 et des co-récepteurs CCR5 ou CXCR4 (spécifique des lymphocytes T4 auxiliaires, macrophages ; Trkola *et al.*, J. Virol., 72, 1876-85, 1998 ; Schols *et al.*, J. Virol., 72, 4032- 4037, 1998 ; Rubbert *et al.*, J. Immunology, 160, 3933-3941, 1998). La liaison de la gp120 au CD4 permet d'exposer la membrane de la cellule cible à la partie hydrophobe amino-terminale de la gp41, ce qui induit le mécanisme de fusion des membranes du virus et des cellules, cette fusion étant à l'origine de la pénétration du virion dans la cellule cible lors de l'infection (Wong-Staal *et al.*, In Molecular Genetic Medicine, 2, Friedman ed., 189-219, 1992 ; Berger *et al.*, Nature, 391: 240, 1998).

Ce processus de reconnaissance du récepteur viral, suivi de la fusion des membranes grâce à l'interaction de l'extrémité amino-terminale de la protéine de fusion avec la membrane de la cellule cible, n'est pas un mécanisme propre au HIV. Il est rendu possible grâce à la présence, sous forme oligomérique, des glycoprotéines transmembranaires du virus. Des pontages par agents chimiques ont permis de mettre

en évidence des trimères au niveau des glycoprotéines de l'enveloppe de MuLV (Pinter *et al.*, J. Virol., 30, 157-165, 1979), de MuMTV (Racevskis *et al.*, J. Virol., 35, 937-948, 1980). Il a aussi été montré que la protéine de l'enveloppe de RSV forme des oligomères retrouvés dans les cellules infectées et les particules virales (Einfeld *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8688-8692, 1988). Le virus de l'influenza exprime également à sa surface une hémagglutinine sous forme trimérique. Dans ce dernier cas, la forme multimérique est nécessaire au transport intracellulaire de la protéine (Copeland *et al.*, J. Cell. Biol., 103, 1179-1191, 1986). L'influenza exprime aussi à sa surface une neuraminidase sous forme de tétramère (Varghese *et al.*, Nature, 303, 35-40, 1983).

Bien que la nature oligomérique des différentes protéines codées par le gène *env* ne fait aucun doute, le nombre de monomère est resté quant à lui sujet à controverse pendant longtemps. La glycoprotéine gp160 a en effet été décrite longtemps comme pouvant s'assembler en dimères ou tétramères (Pinter *et al.*, J. Virol., 63, 2674-2679, 1989; WO94/00557 du CNRS; Schawaller *et al.*, Virology, 172, 367-369, 1989; Earl *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 87, 648-652, 1990; Earl *et al.*, J. Virology, 68, 3015-3026, 1994). D'autres rapports plus récent ont toutefois démontré que la gp160 pourrait s'associer en fait naturellement, par sa partie gp41, sous la forme de trimères (Min Lu *et al.*, Nature Structural Biology, 2, 1075-1082, 1995; Weisshorn *et al.*, EMBO J., 15, 1507-1514, 1996; Weisshorn *et al.*, Nature, 387, 426-430, 1997), les formes dimériques ou tétramériques résultant en fait de ponts disulfures inter-chaînes aberrants, ou de formes oligomériques transitoires (voir ci-dessous).

Dans un but vaccinal, on peut produire et purifier la glycoprotéine de l'enveloppe de HIV, soit en cultivant le virus HIV sur des lignées cellulaires et en purifiant la glycoprotéine du milieu de culture (WO94/00557 du CNRS), soit en exprimant un recombinant de cette protéine par un vecteur différent de l'HIV, et en la purifiant du milieu de culture (WO91/13906, Chiron).

La purification de gp160 à partir de cellules infectées par HIV ne permet que d'obtenir des tétramères, probablement une forme oligomérique transitoire, c'est à dire une forme qui ne correspond pas à celle prise par sa partie gp41 à la surface du virus (WO94/00557 du CNRS).

5 L'expression d'un recombinant de la gp160 par un vecteur différent de l'HIV, bien que présentant l'avantage de se soustraire aux dangers liés à l'agent infectieux HIV, ne permet pas aussi de retrouver la structure oligomérique "native" de la gp160. En effet, VanCott *et al.* ont montré que la gp160 recombinante exprimée par la vaccine, bien que présentant un pouvoir d'adhésion au CD4, comporte des différences structurelles (J. Imm. Meth., 183, p. 114, col. 1, li. 19-22, 1995). Randall *et al.* ont également montré que la gp160 recombinante exprimée par la vaccine comporte des ponts disulfures inter-châînes abbréants (Virology, 179, 827-833, 1990).

10 15 Récemment, Parren *et al.* ont mis en évidence une corrélation entre l'obtention d'anticorps pouvant neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par HIV et la nature oligomérique de la gp120 (J. of Virology, 72, 3512-3519, 1998). Pour cela, Parren *et al.* ont utilisé une gp120 exprimée par HIV dans des cellules infectées, probablement pour contourner les problèmes liés aux différences structurales entre une gp120 native, exprimée à la surface du HIV, et celles produites par des vecteurs d'expression, telle que la vaccine.

20 Par ailleurs, on sait que des anticorps spécifiques de la structure oligomérique de la gp160 peuvent être générées (Earl *et al.*, *supra*), et participent de fait à un effet neutralisant contre l'infection *in vitro* de cellules par le HIV.

25 La présente invention vise à fournir un procédé d'obtention de produits d'expression du gène *env* recombinant permettant la restauration de leur forme trimérique, cette forme étant utilisable dans le cadre d'une vaccination ou dans la mise en œuvre d'un diagnostic d'infection par HIV. En effet, les essais cliniques conduits sur des gp160 recombinantes posent le problème du spectre d'inhibition qui reste limité à quelques souches virales uniquement (Pialoux *et al.*, Aids Res. Hum. Retr., 11, 373-381, 1995 ; Salmon-Céron *et al.*, Aids Res. Hum. Retr., 12, 1479-1486, 1995).

30 A ce jour, bien que la forme trimérique d'une gp160 a été plusieurs fois identifiée dans un mélange d'autres formes polymériques, personne n'a purifié, ni suggéré de purifier, la forme trimérique de la gp160. La présente vise à pallier ce besoin.

35

Résumé de l'invention

A cet effet, l'invention concerne toute glycoprotéine recombinante purifiée répondant aux propriétés suivantes :

- 5 a) une capacité d'adhésion au CD4 ;
- b) une affinité avec un anticorps anti-gp120 capable de neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par HIV ;
- c) une affinité avec un anticorps anti-gp41 ;
- d) une forme trimérique dépourvue de ponts disulfures inter-chaînes

10 Un deuxième objet de la présente invention concerne un vaccin comprenant la glycoprotéine purifiée selon l'invention, et un adjuvant.

15 Un troisième objet de la présente invention concerne l'utilisation de la glycoprotéine selon l'invention dans la mise en œuvre de toute méthode de diagnostic *in vitro* d'infections causées par HIV.

20 Un dernier objet de la présente invention concerne un procédé d'obtention d'une glycoprotéine selon l'invention, dans lequel on exprime, aux moyen de techniques de recombinaison génétique, une glycoprotéine répondant aux propriétés a), b) et c) selon l'invention, on la purifie, et on la soumet à des étapes impliquant au moins un agent réducteur, un détergent ionique et/ou un détergent neutre dans des conditions telles que l'on obtient une glycoprotéine répondant aux conditions selon l'invention.

25 Description détaillée de l'invention

30 Dans le cadre de la présente invention, la capacité d'adhésion au CD4 peut être déterminée par une précipitation radio-immune, par ELISA ou par résonance plasmonique de surface, le détail des ces méthodes étant exposé dans la suite de la description. Ces méthodes sont susceptibles d'être modifiées dans la limite des connaissances actuelles, l'objectif étant de s'assurer simplement que la glycoprotéine selon l'invention forme bien un complexe avec le CD4.

35 Les molécules de CD4 peuvent être préparées de toutes sortes de manières différentes, incluant une purification depuis une source naturelle, ou le recours à des techniques de recombinaison génétique. Dans ce cadre, on peut utiliser les CD4 décrits dans WO8903222, WO8902922, Smith *et al.* (Science, 238, 1704-1707, 1987)

et Littman *et al.* (Nature, 325, 453-455, 1987), par exemple. La société ERC BioServices Corporation, 649A Lofstrand Lane, Rockeville, MD 20850, USA, commercialise également un CD4 produit par les cellules CHO ST4.2 (*In* : Aids Research and Référence Reagent Program Catalog, the Nat. Inst. Helath U.S.D.H.H.S.), par exemple.

De préférence, la capacité d'adhésion est au moins identique à celle d'une gp120 d'une souche d'HIV infectieux, par exemple une gp120 provenant des isolats SF2, HXB2, BRU, MN, SC, NY5, CDC4, WMJ2, RF, MAL, ELI, Z96, Z3, Z321 et 10 JY15 (Myers *et al.*, Human Retroviruses and Aids, Los Alamos, New Mexico, 1990), ou des autres isolats décrits par Tersmette *et al.* (J. Virol., 62, 2026-2032, 1988), Popovic *et al.* (Science, 224, 497-500, 1984), et EP541753 (Transgène S.A.), par exemple.

15 L'affinité mesurée (K_d) par résonance plasmonique de surface peut être aussi de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-12} M, de préférence 10^{-9} à 10^{-11} M, ce qui est conforme aux affinités déjà mesurées pour des gp120 (Smith *et al.*, Science, 238: 1704, 1987 ; Lasky *et al.*, Cell, 50: 975, 1987), par exemple.

20 La glycoprotéine recombinante selon l'invention présente aussi une affinité avec un anticorps anti-gp120 capable de neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par HIV. Le terme "anticorps" regroupe toutes les immunoglobulines ou fragments de celles-ci, d'original polyclonale, monoclonale ou chimérique (voir US4816397), par exemple. Tous les anticorps connus, ou susceptibles d'être préparés, capables de 25 reconnaître un épitope de la gp120 et de neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par un HIV, peuvent être pris en compte dans le cadre de la présente invention. Il suffit qu'une glycoprotéine du HIV présente une affinité avec un anticorps de ce type pour qu'on la considère comme répondant aux besoins de la présente invention. Sans vouloir être limité par les techniques et anticorps utilisables pour les besoins de 30 l'invention, à titre d'information, on peut citer les articles de VanCott *et al.* (1995, *supra*), et Earl *et al.* (1994, *supra*), par exemple.

En ce qui concerne les tests de mesure de l'efficacité neutralisante d'un anticorps *in vitro*, on peut citer les articles de Pialoux *et al.* (1995, *supra*) et Salmon-Céron *et al.* (1995, *supra*), par exemple. Il suffit d'observer une neutralisation *in vitro* de l'infection de cellules par HIV, quelque soit le seuil de neutralisation, pour considérer que l'anticorps satisfait aux besoins de la présente invention.

Par ailleurs, la glycoprotéine recombinante selon l'invention présente aussi une affinité avec un anticorps anti-gp41. Les remarques exposées ci-dessus s'applique *mutatis mutandis* à la gp41, à la différence près que l'effet neutralisant d'un anticorps anti-gp41 n'est pas important, tout en pouvant être un critère préférentiel à ne pas négliger.

La mesure de l'affinité de la glycoprotéine sous forme trimérique avec les anticorps anti-gp41 et anti-gp120 peut être effectuée par une réaction immunologique direct avec l'anticorps, ou par ELISA, par exemple. Les conditions opératoires peuvent varier dans les limites des connaissances actuelles, les variations et/ou adaptations par rapports aux techniques connues ne représentant pas en fait un obstacle difficile pour l'homme du métier.

La forme trimérique de la glycoprotéine selon l'invention peut être observée sur gel SDS PAGE en condition réductrice ou non (voir l'exemple 1). L'homme du métier peut cependant recourir à toutes sortes d'autres analyses, comme la centrifugation analytique ou l'analyse par diffusion de la lumière. L'objectif est simplement de mettre en évidence l'association de trois molécules de gp160 non-liées par des ponts inter-chaînes.

La glycoprotéine selon l'invention, en répondant aux propriétés exposées ci-dessus, peut donc être composée de tout ou partie de la protéine gp41, et de tout ou partie de la protéine gp120. De ce fait, cette glycoprotéine peut être codée par tout ou partie d'un gène *env*, natif (provenant d'un isolat d'HIV) ou non, ladite glycoprotéine étant soit purifiée à un stade où le clivage n'est pas encore effectuée *in situ*, ou ledit clivage étant rendu inopérant soit à cause de la nature de l'hôte cellulaire qui ne serait pas pourvu des enzymes nécessaires, soit à cause d'inhibiteurs de ces enzymes, soit encore du fait que le site de clivage a été génétiquement modifié, par exemple.

La modification génétique du site de clivage est bien connu de l'homme du métier, et permet d'obtenir des protéines entières, de tailles variables, renfermant tout ou partie de la gp41 et tout ou partie de la gp41. A titre d'information, non limitative, on peut citer les glycoprotéines gp160 et gp140 décrites par EP541753 (*supra*), EP679187 (*supra*), Earl *et al.* (1994, *supra*), Kieny *et al.* (1988, *supra*), l'enseignement technique de cette littérature étant incorporé par référence dans la description de la présente invention.

Plus particulièrement, on peut utiliser comme source de gène *env*, tous les isolats de HIV connus, notamment ceux décrits ci-dessus. Le clonage peut être avantageusement effectué par la technique PCR, suivie d'une insertion du fragment d'ADN dans un vecteur approprié. On peut ensuite supprimer le(s) site(s) de clivage par mutagenèse dirigée comme décrit par Kieny *et al.* (1988, *supra*), ou dans l'exemple 1 ci-après. La préparation des vecteurs, et toutes les autres procédures techniques peuvent être effectuées selon les protocoles décrits dans les ouvrages de Sambrook *et al.* (*Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor 10 Laboratory Press, U.S.A., 1989).

Le vecteur d'expression dans lequel on clone finalement le fragment d'ADN codant pour une glycoprotéine selon l'invention, peut être un plasmide, un phage, un ADN entier de virus, un cosmide, un ADN destiné à s'intégrer dans une cellule, etc. 15 Ce vecteur comprend de préférence des séquences régulant l'expression du gène *env*, et le cas échéant d'autres séquences régulant la translocation de la glycoprotéine vers la membrane de la cellule hôte productrice. Les cellules hôtes les plus adaptées, en raison d'un glycosylation proche voire identique à celle désirée, sont des cellules eucaryotes supérieures, pouvant inclure, par exemple, des lignées cellulaires 20 immortalisées provenant du singe (Cos-7, ATCC CRL 1651 ; Vero76, ATCC CRL 1587), du hamster (BHK, ATCC CRL 10 ; CHO, PNAS USA, 77 :4216, 1980), de la souris (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23, 243-251, 1980), de l'homme (Hela, ATCC CCL2 ; W138, ATCC CCL75 ; Hep G2 ; HB 8065), du chien (MDCK, ATCC CCL34), etc.

25

Les vecteurs d'expression les plus appropriés sont ceux se reproduisant dans des eucaryotes, notamment le virus de la vaccine qui est bien connu dans l'art antérieur (WO86/07593), par exemple.

30

Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention, on peut produire notamment des gp160 selon l'enseignement décrit dans EP541753 (*supra*), ou des gp140 selon la méthode de Earl *et al.* (1990, *supra*), voire tout autre variant de glycoprotéine dans laquelle une ou plusieurs parties de gp41 et/ou gp120 seraient éliminées, l'objectif étant que la partie gp41 soit suffisante pour que la formation de trimères s'effectue, et que la partie gp120 soit suffisante pour être reconnue par des anticorps anti-gp120 neutralisants et par le CD4. Pour faire le choix de gènes *env* modifiés répondant aux besoins de la présente invention, l'homme du métier, est à

même de procéder par étape ou par hasard, et de choisir ensuite parmi toutes les séquences ne répondant pas à nos besoins, celles qui y satisfont.

Après avoir produit la glycoprotéine par des techniques de recombinaison 5 génétique, ou par infection de cellules avec HIV, on la purifie au moyen de techniques connues de l'homme du métier, notamment celles faisant intervenir des lectines de lentille (Pialoux *et al.*, 1995, *supra* ; Salmon-Céron *et al.*, 1995, *supra*), celle décrite dans WO91/13906 (*supra*) pouvant être éventuellement encore adaptée aux besoins de la présente invention, ou même celle décrite à l'exemple 1 (immuno-affinité), par 10 exemple.

Rn ce qui concerne les protéines recombinantes, on peut noter qu'une partie des glycoprotéines ainsi purifiées présentent des ponts disulfures inter-chaînes, quelque soit la nature de l'hôte ou du vecteur utilisé. Les glycoprotéines s'associent 15 en fait en dimères (une partie étant covalents) visibles sur gel SDS PAGE après fixation par un agent de pontage. En ce qui concerne les glycoprotéines purifiées de cellules infectées par HIV, celles-ci se présentent aussi sous forme de tétramères (WO94/00557, *supra*).

20 Afin de répondre aux besoins de la présente invention, on dissocie donc les glycoprotéines, puis on les soumet à des conditions favorisant leur ré-assemblage naturel, c'est à dire sous forme de trimères. Pour cela, on soumet la glycoprotéine à des étapes impliquant au moins un agent réducteur, un détergent ionique et/ou un détergent neutre dans des conditions telles que l'on obtient une glycoprotéine 25 satisfaisant aux besoins de la présente invention.

On peut choisir un ou plusieurs agent(s) réducteur(s) parmi les molécules de dithiothréitol, β -mercaptoproéthanol, glutathion réduit ou le borohydrure de sodium, par exemple.

30 On peut choisir un ou plusieurs détergent(s) ionique(s) parmi les sels de dodécyl sulfate, notamment le dodécyl sulfate de sodium (SDS) ou de lithium, les sels de dioctyl sulfosuccinate (de sodium, par exemple), les sels de cétryltriméthylammonium (de brome, par exemple), les sels de cétylpyridinium (de chlore, par exemple), les N-dodécyls- ou N-tétradécyl-sulfobétaïne, les zwittergents 35 3-14, et le 3-[(3-cholamidopropyl)-diméthylamino]-1-propane sulfonate (CHAPS), par exemple.

De même, on peut choisir un ou plusieurs détergent(s) neutre(s) parmi le tween20®, le tween80®, l'octylglucoside, le lauryl-maltoside, l'hecameg®, le lauryl-diméthylamine, le décanoyle-N-méthyl-glucamide, le polyéthylène-glycol-lauryl-éther, 5 le triton X100®, le Lubrol PX®, par exemple.

Les conditions opératoires doivent être suffisantes pour dissocier les 10 glycoprotéines, et les ré-assembler en trimères. Pour cela, généralement on peut dissocier les glycoprotéines à l'aide d'un ou plusieurs détergent(s) ionique(s), en présence d'agent réducteur ou non, puis on peut favoriser le réassemblage des monomères en substituant le détergent ionique par un détergent neutre, par exemple au moyen d'une dialyse. De cette manière, on est assuré d'obtenir une glycoprotéine 15 selon l'invention comprenant moins de 50% d'autres contaminants protéiques (constitués principalement par des dimères covalents)

15

De préférence, pour obtenir exclusivement des trimères de glycoprotéines selon 20 l'invention, on soumet au cours du traitement les glycoprotéines purifiées à un agent réducteur, de sorte à libérer les dimères covalents, le cas échéant on bloque des fonctions sulfhydryls libres au moyen de molécules appropriées, telles que des agents d'alkylation comme le N-éthyl-maléimide ou l'iodo-acétamide, puis on ré-oxyde doucement les fonctions sulfhydryls restantes en présence d'un agent oxydant tel que du glutathion oxydé, par exemple.

Dans un mode de réalisation particulier de la présente invention, on peut 25 soumettre la glycoprotéine purifiée successivement à un agent réducteur, à un agent d'alkylation, à un agent oxydant, à un détergent ionique et à une dialyse contre un détergent neutre, par exemple

Dans un autre mode de réalisation particulier de la présente invention, on peut 30 soumettre la glycoprotéine purifiée successivement à un détergent ionique, à un agent réducteur, à un agent oxydant et à une dialyse contre un détergent neutre.

A la fin du procédé, on peut substituer le détergent neutre par un tampon approprié, par exemple au moyen d'une dialyse.

35

Un autre objet de la présente invention concerne un vaccin comprenant la glycoprotéine selon la présente invention et un adjuvant. Ce vaccin peut contenir

comme antigène de surface du HIV uniquement la glycoprotéine selon la présente invention, les formes dimériques ou monomériques d'une gp160 ou gp120 étant spécifiquement exclues, par exemple, pour des raisons d'immunogénicités réduites. On peut également adjoindre à ce vaccin d'autres valences concernant d'autres maladies, les quantités d'antigènes et/ou la formulation de chaque valence devant néanmoins être probablement optimisée(s) de sorte à assurer une réponse immunitaire efficace, par exemple. Les valences d'autres pathogènes peuvent provenir de bactéries, de virus ou de parasites, par exemple ceux provoquant des hépatites (A à G), la rougeole, les oreillons, la polio, la tuberculose, la diphtérie, la malaria, etc.

10

Parmi les adjuvants utilisables, on peut dénombrer tous les sels d'aluminium, comme les phosphates et hydroxydes d'aluminium ; l'adjuvant de Freund ; le N-acétylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamyl-L-alanine-2-[1,2-dipalmitoyl-sn-glycéro-3-(hydroxyphosphoryloxy)] (voir Sanchez-Pescador *et al.*, *J. Immu.*, 141, 1720-1727, 1988) ; les molécules dérivées de *Quillaja saponaria*, comme le Stimulon® (Aquila, US) ; l'Iscoms® (CSL Ltd, US) ; toutes molécules à base cholestérol et analogues, comme le DC Chol® (Targeted Genetics) ; le glycolipide Bay R1005® (Bayers, DE) ; les antigènes de *Leishmania brasiliensis* comme le LeIF (nom technique) disponible auprès de Corixa Corp. (US), les polymères de la famille de polyphosphazènes, comme l'Adjumer (nom technique) disponible auprès du "Virus Research Institute" (US).

Les compositions vaccinales selon l'invention peuvent être utilisées pour la prévention d'infections par le HIV-1, le dosage et la voie et la fréquence d'administration devant cependant être probablement optimisé de sorte à obtenir une réponse immunitaire efficace.

Un dernier objet de la présente invention concerne l'utilisation de la glycoprotéine selon l'invention dans la mise en œuvre de toute méthode de diagnostic *in vitro* d'infections causées par HIV.

D'autres caractéristiques de la présente invention apparaîtront au cours des descriptions suivantes d'exemples de formes de réalisation qui sont fournis à des fins d'illustration de la présente invention et qui ne sont pas destinés à être limitatifs. La manipulation des cellules, la préparation des vecteurs, la transformation de cellules, et toutes les autres procédures techniques sont, en l'absence de précisions contraires, effectués selon les protocoles décrits dans l'ouvrage de Sambrook *et al.* (1989, *supra*).

Ces exemples sont précédés d'une brève description de la figure 1, et des méthodes mesurant l'affinité de la gp160 au CD4.

Mise en évidence d'une affinité au CD4 par précipitation radio-immune : on utilise un CD4 recombinant marqué au soufre 35 produit par des cellules CHO (Genentech, USA ; VanCott *et al.*, 1995, *supra*). On effectue ensuite des expériences de co-précipitation, au cours desquelles le CD4 est ajouté en quantité croissante à une quantité fixe de gp160 purifiée sous forme trimérique pour déterminer le point de saturation, puis on les coprécipite avec un antisérum anti-gp160. Pour cela, on mélange le CD4 et la gp160 pendant 1 h à 4°C, on ajoute l'anticorps (OKT4, Ortho Diagnostics, US), on lave les complexes, et on les sépare par électrophorèse.

Mise en évidence d'une affinité au CD4 par ELISA : la mesure des constantes d'affinité du CD4 pour la glycoprotéine selon l'invention est mesurée en utilisant la technique de Friguet *et al.* (J. of immunological methods, 77, 305-319, 1985).

Mesure de l'affinité de la gp120 sur le CD4 par résonance plasmonique de surface : le Biacore® est un appareil pour l'analyse des interactions biospécifiques en temps réel et sans marquage qui utilise le principe de résonance plasmonique de surface. Lors de l'analyse, un des interactants (le ligand) est couplé à une matrice hydrophile (dextran) ou hydrophobe (surface HPA). L'autre interactant (analyte) passe au contact de la surface par l'intermédiaire d'une cartouche de transfert microfluidique. L'augmentation de masse au voisinage de la surface due à l'interaction entre les molécules, est représentée en fonction du temps sur un sensorgramme. Différentes chimies de couplage permettent la fixation de pratiquement toutes les biomolécules sur la matrice. L'utilisateur crée donc une surface biospécifique sur mesure, pour chaque type d'application. En pratique la glycoprotéine selon l'invention est couplée sur la matrice et différentes concentration de CD4 sont envoyées par l'appareil au contact de cette matrice. A chaque fois la masse de CD4 fixée sur la glycoprotéine est enregistrée. Le logiciel Biaeval3® calcule automatiquement la constante de dissociation du CD4 sur la gp120.

Figure 1 : représentation de l'analyse SDS PAGE en condition réductrice obtenue avec la gp160 produite par VVTG9150, purifiée, traitée pour faire des trimères et fixée par un agent de pontage (col. 3 et 4) ; au regard de celle obtenue en condition réductrice avec la gp160 produite par VVTG9150, purifiée et directement fixée (col. 2) ; au regard de celle obtenue en condition réductrice avec des monomères de gp160

(col. 5 et 6) ; et au regard de celle obtenue en condition non-réductrice avec la gp160 produite par VVTG9150 et purifiée (col. 7).

Exemple 1

5

Un vecteur recombinant basé sur le virus de la vaccine, VVTG9150, est utilisé pour la production de gp160. La construction du plasmide de transfert du gène codant pour la protéine *env* hybride HIV-1_{MN/LAI} dans le génome du virus de la vaccine VVTG9150 est décrite ci-après.

10

Le fragment d'ADN *PstI-KpnI* de pTG1163, réf. Kieny *et al.* (Prot. Eng., 2, 219-225, 1998) qui contient la séquence codant pour le peptide signal et les premiers acides aminés de la gp120 du virus HIV-1_{LAI}, est inséré aux sites *PstI* et *KpnI* du bactériophage M13TG130, réf. Kieny *et al.* (Gene, 26, 91-99, 1983) générant M13TG4147. Le fragment *PstI-PstI* de pTG1163, contenant la totalité du gène codant pour une gp160/soluble de HIV-1_{LAI} est introduit dans le site de *restriction PstI* de M13mp70, générant M13TG4137. L'ADN du bactériophage M13TG4137 est ensuite coupé par *BgIII*, digéré par la polymérase I (fragment de Klenow) afin de générer une extrémité franche, puis coupé par *EcoRI*, afin d'être inséré aux sites *EcoRV* et *EcoRI* du bactériophage M13TG4147, générant M13TG4158. Une délétion sur M13TG4158 est ensuite réalisée avec un oligonucléotide, qui permet l'introduction d'un site *SphI* et d'un site *SmaI*. On obtient le bactériophage M13TG4168. Le gène codant pour la gp120_{MN} est ensuite amplifié à partir d'ADN de cellules SupT1 infectées avec le virus HIV-1_{MN} par la technique de PCR avec des oligonucléotides qui introduisent respectivement des sites *SphI* et *SmaI*. Le fragment d'ADN amplifié est ensuite digéré par *SphI* et *SmaI* et inséré aux sites correspondant de M13TG4168, générant M13TG4174. Une mutagénèse dirigée sur M13TG4174 est réalisée avec un oligonucléotide permettant de muter un site potentiel d'arrêt de transcription (TTTTTNT) reconnu par le virus de vaccine dans les gènes précoce et d'introduire un site de restriction *EcoRI*, générant ainsi M13TG8120. Le fragment *PstI-PstI* de M13TG8120 est ensuite cloné dans le site *PstI* du plasmide pTG9148 générant pTG9150 (le virus VVTG9150 après transfection).

35

pG9148 est d'ailleurs généré de la façon suivante : la séquence correspondant au promoteur H5R du virus de la vaccine est amplifiée par la technique de PCR avec des oligonucléotides introduisant respectivement des sites *BamHI* et *BgIII*. Le fragment d'ADN amplifié est ensuite digéré par *BgIII* et *BamHI* et inséré aux sites

correspondant de M13TG6131 (Gene, 26, 91-99, 1983) générant M13TG8124. Le fragment BamHI-BgIII de M13TG8124 contenant la séquence promotrice HSR est introduit dans le site de restriction BamHI de pTG9133 générant pTG9145. Le plasmide pTG9133 a été construit par introduction d'un site *BamHI* entre les sites *Clal* et *EcoRI* de pTG1H-TK (Nature, 312, 5990, 163-166, 8 Nov. 1984) par ligation d'un adaptateur OTG4451/OTG4452. Un site de clonage multiple issu de M13TG131 digéré par *Bg/II* et *EcoRI* est introduit dans les sites *BamHI* et *EcoRI* de pTG9145 générant pTG9148.

En conclusion, VVTG9150 code donc pour une gp160 hybride et soluble dans laquelle la partie gp120 dérive du HIV-1MN, et la partie transmembranaire gp41 provient d'un isolat LA1. Plusieurs modifications sont en outre introduites dans cette séquence codante. Premièrement, un site de restriction *SphI* est créé immédiatement en aval de la séquence codant pour le peptide signal, sans altérer la séquence en acides aminés. Deuxièmement, un site de restriction *SmaI* est créé immédiatement au-dessus de la séquence de clivage entre la gp120 et la gp41, sans altération de la séquence en acides aminés. Troisièmement, les deux sites de clivage en position 507-516 (numérotation des acides aminés conforme à Myers et al., in : Human retroviruses and AIDS, Los Alamos Nat. Lab., USA, 1994) sont mutés (séquence originale KRR...REKR muté en QNH...QEHN). Quatrièmement, la séquence codant pour le peptide hydrophobe transmembranaire IFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIV (acides minés 689-710 de Myers et al.) est supprimée. Cinquièmement, un codon stop a été substitué pour le second codon E codant PEGIEE (acides aminés 735-740 de Myers et al.), c'est-à-dire le 29^{ème} acide aminé du domaine intracytoplasmique.

25

VVTG9150 est ensuite propagé pour produire la gp160 hybride sur des cellules BHK21, dans des conditions conventionnelles (Nature, 312, 163-166, 1984).

La glycoprotéine hybride gp160 est alors purifiée successivement par chromatographies échangeuse d'ions, une chromatographie d'immunoaffinité, une gel filtration, et une concentration. En résumé, on fait passer le milieu de culture contenant la gp160 successivement au travers de deux supports DEAE Trisacryl LS Plus®, mis en équilibre dans des colonnes BPG200® et BPG100® (Pharmacia) avec un tampon pH 8,3 contenant 2,42 g/l de Tris et 1 ml/l de triton X100. Puis on fait passer les fractions d'élution contenant la gp160 au travers d'un support AF-Tresyl Toyopearl® (Tosoh Corp, JP) sur lequel a été greffé l'anticorps IAM5F3 (publication ?) et qui a été mis à l'équilibre dans un tampon composé de 29,22 g/l de

NaCl, 2,42 g/l de Tris et 1 ml/l de triton X100. On collecte l'élution dès l'augmentation de DO visible sur l'écran et ce, jusqu'à la ligne de base. On neutralise ensuite le pH de l'élution avec 4% (v:v) de tampon Tris HCl 2M. On soumet l'élution neutralisée à une filtration surgel dans une colonne XK 50/100® contenant le support sephacryl HR S300 mis à l'équilibre dans un tampon PBS. Si la concentration en protéines est alors inférieure à 0,44 mg/ml, on concentre l'élution dans une cellules Amicon® équipée d'une membrane YM30. Puis, on inactive l'élution ou le concentrat dans un bain marie à 60°C pendant 1 h, et on le filtre (0,22µm) dans un flacon Nalgène®. On peut ainsi obtenir environ 1,34 mg/ml de gp160 pure à 91 % (visualisée sur SDS PAGE).

A partir de 560 µl de gp160 purifiée (1mg/ml), on ajoute 65 µl de tampon 1M phosphate de sodium pH7,8 ; 5,5 µl d'eau distillée et 19,5 µl de dithiothreitol 250 mM (DTT), et on agite au vortex pendant 15 s. On ajoute 51,5 µl de phosphate de sodium 1M (NaH2PO4), puis on bloque les groupes sulphydryls par addition de 95 µl de N-ethyl-maléimide 100mM, on incube pendant 15 min, on réoxyde les groupes sulphydryls par addition de 32,5 µl de glutathion réduit à 150 mM, et 484 µl de glutathion oxydé à 100 mM, on incube pendant 30 min. On dissocie ensuite les dimères de gp160 par addition de 13,2 µl de dodecyl sulfate de sodium (SDS) à 10%.
On place l'échantillon dans une cassette de dialyse d'une capacité de 3 ml contre 3 l de tampon PBS avec 10mM d'octylglucoside. On effectue la dialyse pendant la nuit à température ambiante sous agitation douce. On élimine enfin le détergent par une ou plusieurs nouvelles dialyses contre du tampon PBS. Les gp160 ainsi traitées se retrouvent sous forme de trimères exclusivement.

La figure 1 représente l'analyse SDS PAGE en condition réductrice (DTT) obtenue avec la gp160 produite par VVTG9150, purifiée, traitée pour faire des trimères et fixée par l'agent de pontage bi-fonctionnel éthylène-glycol-bis-succinimidyl-succinate (EGS) (col. 3 et 4) ; au regard de celle obtenue en condition réductrice avec la gp160 produite par VVTG9150, purifiée et directement fixée par l'EGS (col. 2 : des dimères) ; au regard de celle obtenue en condition réductrice avec des monomères de gp160 (col. 5 et 6) ; et au regard de celle obtenue en condition non-réductrice avec la gp160 produite par VVTG9150 et purifiée (col. 7 : en absence d'agent réducteur, les liaisons inter-chaînes conduisent à la formation de dimères, trimères et tétramères).

Exemple 2

On exprime par le virus de la vaccine une gp120 prolongée des 129 premiers acides aminés de la partie N-terminale de la gp41, comme décrit par Earl *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 648-652, 1990. Dans la mesure où la partie gp41 est limité à ses 129 premiers acides aminés, celle-ci ne comporte pas de région trans-membranaire. Cette glycoprotéine présente sur gel SDS PAGE un poids moléculaire de l'ordre de 140 kD et est communément appelée gp140.

On purifie cette gp140 successivement par chromatographie d'échange d'ions, chromatographie d'affinité avec des lectines de lentilles, et par gel filtration, comme décrit par Pialoux *et al.* (1995, *supra*) et Salmon-Céron *et al.* (1995, *supra*).

A partir de 100 µl de gp140 purifiée (1mg/ml), on ajoute 2 µl de dithiothreitol 250 mM (DTT), et 10 µl de SDS (10%), on incube le mélange pendant 15 min, on lui ajoute 20 µl de glutathion oxydé (250mM), on l'incube une nuit à 4°C, puis on place l'échantillon dans une cassette de dialyse d'une capacité de 3 ml contre 3 l de tampon PBS contenant 10mM d'octylglucoside. On effectue la dialyse pendant la nuit à température ambiante sous agitation douce. On élimine enfin le détergent par une ou plusieurs nouvelles dialyses contre du tampon PBS. Contre toute attente, cette méthode permet d'éliminer tous les ponts disulfures inter-chaînes sans que l'on ait à bloquer les groupes sulfhydryls avec un agent alkylant. Les gp140 ainsi traitées se retrouvent sous forme de trimères exclusivement.

Exemple 3

25

On exprime par le virus de la vaccine une gp160 telle que décrite par Kieny et al. (Protein Engineering, 2, 219-225, 1988). On la purifie comme décrit à l'exemple 1, puis on la traite avec du SDS, et on la dialyse contre un tampon PBS contenant 10mM d'octylglucoside. On obtient après traitement un mélange de trimères non-covalents et de dimères covalents de la gp160, la forme prédominante étant constituée de trimères.

Revendications

1. Glycoprotéine recombinante purifiée répondant aux propriétés suivantes :

- 5 a) une capacité d'adhésion au CD4 ;
- b) une affinité avec un anticorps anti-gp120 capable de neutraliser *in vitro* l'infection de cellules par HIV;
- c) une affinité avec un anticorps anti-gp41 ;
- d) une forme trimérique dépourvue de ponts disulfures inter-chaînes.

10 2. Glycoprotéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que la glycoprotéine est composée de tout ou partie de la gp160.

15 3. Glycoprotéine selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle comprend moins de 50% d'autres contaminants protéiques.

20 4. Glycoprotéine selon la revendication 1, caractérisée en ce que la capacité d'adhésion au CD4 est au moins identique à celle d'une gp120 d'un HIV infectieux.

20 5. Vaccin comprenant la glycoprotéine purifiée selon la revendication 1, et un adjuvant.

25 6. Vaccin selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il contient comme antigène de surface du HIV uniquement la glycoprotéine selon la revendication 1.

30 7. Procédé d'obtention d'une glycoprotéine selon la revendication 1, dans lequel on exprime, aux moyen de techniques de recombinaison génétique, une glycoprotéine répondant aux propriétés a), b) et c) énoncées à la revendication 1, on la purifie, et on la soumet à des étapes impliquant au moins un agent réducteur, un détergent ionique et/ou un détergent neutre dans des conditions telles que l'on obtient une glycoprotéine répondant aux conditions énoncées à la revendication 1.

35 8. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on soumet la glycoprotéine purifiée successivement à un agent réducteur, à un agent d'alkylation, à un agent oxydant, à un détergent ionique, et à une dialyse contre un détergent neutre.

9. Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'on soumet la glycoprotéine purifiée successivement à un détergent ionique, à un agent réducteur, à un agent oxydant, et à une dialyse contre un détergent neutre.
- 5 10. Utilisation de la glycoprotéine selon la revendication 1 dans la mise en œuvre d'une méthode de diagnostic *in vitro* d'infections causées par HIV.

Figure 1

